

LA DETERMINAZIONE DELLA MIC COME STRUMENTO DECISIONALE NELLA SCELTA DELLA TERAPIA ANTIBIOTICA IN AMBITO SUINICOLO

MIC DETERMINATION AS A DECISION TOOL FOR ANTIMICROBIAL THERAPY IN SWINE INDUSTRY

VIO D., D'ESTE L., GAGLIAZZO L., USTULIN M., TAGLIENTE D., VICENZONI G.F.

Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie

Parole chiave: MIC, antibiotico resistenza, suino

Keywords: MIC, antibiotic resistance, swine

RIASSUNTO

Il fenomeno dell'antibiotico-resistenza rappresenta una grave minaccia alla salute umana e animale; la corretta prescrizione delle terapie antibiotiche si è rivelata tra le iniziative più efficaci per contrastarla.

A partire da gennaio 2017 l'Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie (IZSve), come test di routine volto alla valutazione della sensibilità agli antimicrobici di ceppi batterici isolati nella routine diagnostica da animali da allevamento, ha introdotto la determinazione della Minima Concentrazione Inibente (MIC), abbandonando di fatto la metodica in piastra secondo Kirby-Bauer. Questo test offre informazioni più accurate e può diventare un utile strumento nella pratica veterinaria.

In aggiunta l'IZSve ha messo a disposizione dei veterinari un database digitale che permette di accedere facilmente ai dati MIC degli allevamenti seguiti raccogliendone i dati storici e facilitando la scelta del protocollo terapeutico adeguato.

SUMMARY

The phenomenon of antimicrobial resistance has become a threat for both animal and human health; a correct antimicrobial prescription has shown to be one of the most successful initiatives to fight it.

Since January 2017 the IZSve introduced determination of the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) technique to test for antimicrobial susceptibility bacterial strains isolated from livestock animals during diagnostic routine, replacing the Kirby-Bauer method. This new test provides more accurate information about antimicrobial sensibility, and can be a very useful for private practice veterinarians.

Further IZSve provides veterinarians a digital database where they can visualize all MIC results arranged according to each farm the veterinarian works at. This digital database allows veterinarians to check the clinical history of each farm and choose the most appropriate therapeutic protocol.

INTRODUZIONE

L'antibiotico resistenza è un fenomeno sempre più diffuso che si estrinseca nell'acquisizione della capacità di ceppi batterici di resistere all'attività di una o più classi di antibiotici con conseguente perdita di efficacia terapeutica delle stesse.

Nell'industria suinicola gli antibiotici vengono frequentemente utilizzati per il controllo di patologie enteriche, respiratorie e sistemiche, e la comparsa di ceppi batterici resistenti agli antibiotici può influenzare non solo la filiera di produzione della carne suina ma

avere un impatto sulla salute umana con il trasferimento tramite la catena alimentare di batteri resistenti e geni associati ad antibiotico resistenza (1). In quest'ambito il medico veterinario ha l'importante ruolo di garantire l'uso consapevole e appropriato della terapia antibiotica, la promozione della quale si è finora dimostrato una delle iniziative più efficaci al fine di prevenire e ridurre l'insorgenza e diffusione di fenomeni di antibiotico resistenza.

Per queste ragioni l'Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie (IZSVe) ha introdotto, come metodo di routine per la valutazione dell'antibiotico-sensibilità, la determinazione della Minima Concentrazione Inibente (MIC) (2, 3, 4, 5, 6, 7) mediante micro diluizione in brodo. Questa tecnica permette di fornire informazioni più dettagliate al medico veterinario clinico ai fini di una corretta scelta del trattamento antibiotico. L'IZSVe fornisce inoltre un sistema di archiviazione e consultazione dei dati analitici prodotti dai laboratori che permette al medico veterinario responsabile di allevamento o di filiera di consultare in maniera rapida e semplice i dati di antibiotico sensibilità relativi agli allevamenti di cui è responsabile.

Lo scopo del presente contributo è condividere il funzionamento del sistema di gestione e utilizzo dei dati prodotti nell'attività diagnostica relativamente alle analisi di MIC e di dare una prima visione dei risultati ottenuti nell'ambito suinicolo.

MATERIALI E METODI

A partire dal 2 gennaio 2017 l'IZSVe ha sostituito nella propria routine diagnostica ai fini della valutazione della sensibilità agli antibiotici dei ceppi batterici, la metodica in piastra secondo Kirby-Bauer (KB) con la determinazione della MIC.

Il KB è una metodica di valutazione dell'antibiotico sensibilità di un ceppo batterico che fornisce esclusivamente un dato quantitativo (sensibile VS resistente). Questa metodica si basa sulla disposizione di dischetti di cellulosa impregnati di una quantità nota di farmaco antibiotico su una piastra Petri contenente un idoneo terreno di coltura su cui è stato seminato il ceppo batterico in esame. Durante l'incubazione della piastra il farmaco diffonde dal dischetto nel terreno circostante andando a inibire la replicazione batterica su un'area tanto più ampia quanto maggiore è l'efficacia del farmaco. In base all'ampiezza dell'alone di inibizione della crescita batterica attorno al dischetto, il ceppo in esame sarà definito sensibile o resistente all'antibiotico testato.

La MIC viene determinata invece inoculando un quantitativo noto del ceppo batterico in esame (10^5 Unità Formanti Colonia (UFC)) in brodi di crescita contenenti diluizioni scalari di antibiotico. La diluizione più elevata in grado di inibire la crescita batterica è definita Minima Concentrazione Inibente. La determinazione della MIC permette quindi di avere un dato quantitativo di sensibilità, utile per la scelta del farmaco più appropriato, tramite la comparazione del valore di MIC rilevato per un determinato antibiotico e un determinato ceppo batterico con il valore di breakpoint (BP) che stabilisce il limite tra sensibilità e resistenza per quella classe di antibiotici e quella specie batterica.

Per facilitare il confronto tra le classi di antibiotici testate, l'IZSVe ha introdotto nell'esito, oltre al dato di MIC e al range di diluizioni testate, anche il quoziente, ovvero il rapporto tra il BP di sensibilità e la MIC rilevata. Tale rapporto (quoziente) permette di relativizzare il risultato analitico rilevato al BP rendendo immediatamente confrontabili i risultati ottenuti dalla MIC per diversi antibiotici.

A partire dai dati registrati nel LIMS (Laboratory Information Management System) aziendale (Izilab) è stato creato tramite Qlik Sense®, un prodotto di data visualization, un cruscotto di reportistica online che rende disponibile a ogni veterinario abilitato al sistema la possibilità di visualizzare tutta la propria attività legata alle MIC. L'accesso ai

dati è possibile a medici veterinari che abbiano conferito una quantità minima richiesta di campioni e che ne abbiano fatto richiesta. L'accesso viene garantito tramite username e password da qualsiasi dispositivo fisso o mobile dal sito <https://www.izsvenezie.it/antibiotico-sensibilita-report-mic/>. Accedendo al cruscotto sarà disponibile lo storico dei risultati delle MIC effettuate per ciascun allevamento, con il giudizio di sensibilità calcolato in base ai BP disponibili più recenti. Inoltre, grazie al motore associativo reso disponibile dal software e alla semplicità di esplorazione del dato, è possibile valutare con pochi click l'antibiotico più appropriato tra quelli per cui quel germe è risultato sensibile, scegliendo tra gli antibiotici che hanno il maggior numero di risultati con quoziente alto. I dati aggregati possono essere visualizzati sia in forma tabellare che grafica.

The image shows a screenshot of a web-based data table. The table has columns for 'Farmacia', 'Antibiotico', 'MIC', and 'Quoziente'. The rows list various antibiotics such as Amoxicillina, Clindamicina, and others, along with their corresponding MIC values and quotient results for different farms. The interface includes a search bar and a filter icon.

Fig 1: distribuzione dei ceppi testati all'interno dei quozienti/distribution of strain among quotient results

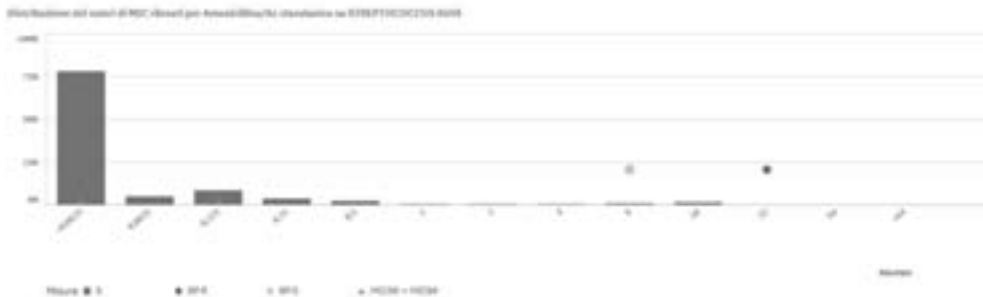


Fig 2: distribuzione dei ceppi testati per valore di MIC ottenuto/distribution of strains among MIC results

RISULTATI

Nei primi 24 mesi di utilizzo della metodica MIC, ovvero tra gennaio 2017 e dicembre 2018, sono stati analizzati nei laboratori di diagnostica dell'IZSVe più di 13.700 ceppi batterici isolati nell'attività di routine effettuata su campioni provenienti da differenti specie zootecniche, in particolare dai settori bovino, suino, cunicolo e avicolo, e da compagnia. Di queste più di 700 sono state eseguite da campioni di suini provenienti da oltre 160 diversi allevamenti. I batteri più rappresentati per il suino sono stati *Escherichia coli* e *Streptococcus suis* seguiti da *Pasteurella multocida* e *Actinobacillus pleuropneumoniae*. I dati ottenuti relativamente alla sensibilità agli antimicrobici per queste specie batteriche sono riassunte in tabella 1 e 2, con particolare attenzione, in tabella 2, per i Critically Important Antimicrobials (CIA).

Specie batterica	Antibiotico	Quoziente Breakpoint MIC										n° campioni	S	%S
		1	2	4	8	16	32	64	128					
ACTINOBACILLUS PLEUROPNEUMONIAE	Amoxicillina /Ac clavulanico	0	0	1	4	14	21	4	5			50	49	98,00%
ACTINOBACILLUS PLEUROPNEUMONIAE	Trimethoprim Sulfametossazolo	3	13	11	8	10	3	0	0			50	48	96,00%
ACTINOBACILLUS PLEUROPNEUMONIAE	Floxacimolo	1	2	11	29	0	0	0	0			50	43	86,00%
ACTINOBACILLUS PLEUROPNEUMONIAE	Ampicillina	2	8	13	6	3	0	0	0			50	30	60,00%
ACTINOBACILLUS PLEUROPNEUMONIAE	Tetraciclina	17	3	2	0	0	0	0	0			50	22	44,00%
ACTINOBACILLUS PLEUROPNEUMONIAE	Spektinomomicina	0	1	0	0	0	0	0	0			50	1	2,00%
ESCHERICHIA COLI	Apramicina	9	28	126	83	10	1	0	0			313	239	82,75%
ESCHERICHIA COLI	Amisolidina	8	37	120	81	5	0	0	0			313	231	80,47%
ESCHERICHIA COLI	Gentamicina	19	2	26	73	81	3	0	0			313	195	62,30%
ESCHERICHIA COLI	Trimethoprim Sulfametossazolo	0	8	4	19	21	68	0	0			313	120	38,34%
ESCHERICHIA COLI	Floxacimolo	66	12	1	0	0	0	0	0			313	79	25,24%
ESCHERICHIA COLI	Ampicillina	1	17	19	11	1	0	0	0			313	49	15,71%
ESCHERICHIA COLI	Tetraciclina	2	17	20	3	3	0	0	1			313	48	14,70%
PASTEURRELLA SPP.	Amoxicillina /Ac clavulanico	1	0	0	2	1	8	45	37			95	94	98,95%
PASTEURRELLA SPP.	Floxacimolo	2	7	72	11	0	1	0	0			96	93	96,88%
PASTEURRELLA SPP.	Ampicillina	1	5	43	30	3	7	0	0			95	89	93,68%
PASTEURRELLA SPP.	Trimethoprim Sulfametossazolo	3	10	11	21	12	4	0	0			96	61	63,54%
PASTEURRELLA SPP.	Tetraciclina	28	13	0	1	2	0	0	0			95	44	46,32%
PASTEURRELLA SPP.	Spektinomomicina	9	2	0	0	0	0	0	0			96	11	11,46%
STREPTOCOCCUS SUI	Amoxicillina /Ac clavulanico	2	1	1	1	3	9	19	193			234	231	98,72%
STREPTOCOCCUS SUI	Ampicillina	8	15	14	12	24	132	0	0			234	225	96,17%
STREPTOCOCCUS SUI	Floxacimolo	119	87	9	1	0	0	0	0			234	207	88,46%
STREPTOCOCCUS SUI	Trimethoprim Sulfametossazolo	14	27	54	40	31	9	0	0			234	173	74,79%
STREPTOCOCCUS SUI	Spektinomomicina	91	43	13	2	1	0	0	0			234	130	54,19%
STREPTOCOCCUS SUI	Tetraciclina	4	2	1	0	0	0	0	0			234	7	2,99%

Tabella 1: numero e percentuale di ceppi batterici per la specie suina sensibili agli antimicrobici testati sul totale dei campioni testati/number and percentage of bacterial strains isolated from swines sensitive to tested antibiotics on total of tested samples

Specie batterica	Antibiotico - CIA	Quoziente Breakpoint MIC										n° campioni	S	%S
		1	2	4	8	16	32	64	128					
ACTINOBACILLUS PLEUROPNEUMONIAE	Ceftiofur	0	0	1	2	0	3	10	33			50	49	98,00%
ACTINOBACILLUS PLEUROPNEUMONIAE	Enrofloxacin	7	1	19	16	2	0	0	0			50	45	90,00%
ACTINOBACILLUS PLEUROPNEUMONIAE	Támicosina	28	5	1	1	0	1	0	0			50	36	72,00%
ESCHERICHIA COLI	Colistina	20	73	117	71	4	0	0	0			313	285	91,05%
ESCHERICHIA COLI	Enrofloxacin	44	18	16	49	72	0	0	0			313	199	63,58%
ESCHERICHIA COLI	Flumequin	39	14	17	86	26	0	0	0			313	182	58,15%
PASTEURRELLA SPP.	Ceftiofur	1	2	1	9	12	7	6	57			96	95	98,96%
PASTEURRELLA SPP.	Enrofloxacin	4	3	6	5	73	0	0	0			96	91	94,79%
PASTEURRELLA SPP.	Támicosina	19	24	29	5	0	1	1	2			96	81	84,38%
STREPTOCOCCUS SUI	Ceftiofur	2	9	24	25	43	72	37	14			234	226	96,58%
STREPTOCOCCUS SUI	Enrofloxacin	41	133	41	6	0	0	0	0			234	221	94,44%
STREPTOCOCCUS SUI	Támicosina	24	21	1	3	1	1	1	0			234	52	22,22%

Tabella 2: numero e percentuale di ceppi batterici per la specie suina sensibili agli antimicrobici CIA testati sul totale dei campioni testati/number and percentage of bacterial strains sensitive to tested CIA on total of tested samples

DISCUSSIONE

Per quanto concerne i CIA testati, i dati raccolti ed elaborati ad oggi dal cruscotto di reportistica interno hanno permesso di rilevare un'elevata diffusione di sensibilità agli antibiotici dei ceppi di *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Pasteurella* spp., *Streptococcus suis* per Cefalosporine di

IV generazione (Ceftiofur) e fluorochinoloni (Enrofloxacin) (più del 90% di ceppi sensibili). Per la Tilmicosina si evidenzia invece scarsa efficacia nei ceppi di *S. suis* (22% di ceppi sensibili). I ceppi di *E. coli* si mostrano per la maggior parte sensibili alla Colistina, circa il 90% dei ceppi testati, maggiore attenzione andrebbe posta invece nell'utilizzo di antibiotici appartenenti alle classi dei chinoloni e fluorichinoloni dove risultano sensibili rispettivamente il 58% e il 64% dei ceppi testati.

Per i restanti antibiotici presenti nei pannelli MIC, per *A. pleuropneumoniae*, *Pasteurella* spp., *S. suis* si osserva che la maggior parte dei ceppi mostra sensibilità agli antimicrobici soprattutto per l'associazione Amoxicillina/Acido Clavulanico e Florfenicolo (>85%). Sono invece molto frequenti ceppi resistenti per Tetracicline e Spectinomicina.

Maggiore attenzione andrebbe posta nei confronti di *E. coli*, per cui si osserva in percentuale una elevata diffusione di ceppi resistenti per Thrimethoprim/Sulfametoxazolo (>60%), Florfenicolo (75%), Penicilline (Ampicillina) (85%) e Tetracicline (85%).

CONCLUSIONI

La possibilità di accedere rapidamente ad un sistema di archiviazione, consultazione e gestione dei risultati delle analisi con metodica MIC dei casi clinici relativi agli allevamenti seguiti, ha lo scopo di facilitare il collega libero professionista nella scelta del più corretto protocollo terapeutico e permette di verificare rapidamente variazioni dell'antibiotico sensibilità nel tempo contribuendo quindi al contenimento dello sviluppo di fenomeni di antibiotico resistenza. Il dato storico di MIC può essere utilizzato anche, tramite il monitoraggio periodico, per costruire uno storico di allevamento che faciliti la scelta di una terapia adeguata i primi sintomi di malattia.

Sul sito web dell'IZSVe (<https://www.izsvenzie.it/temi/altri-temi/antibiotico-resistenza-sensibilita/report-pubblico/>) è inoltre disponibile un report generale costruito sulla base dei dati

Distribuzione per specie delle MIC eseguite

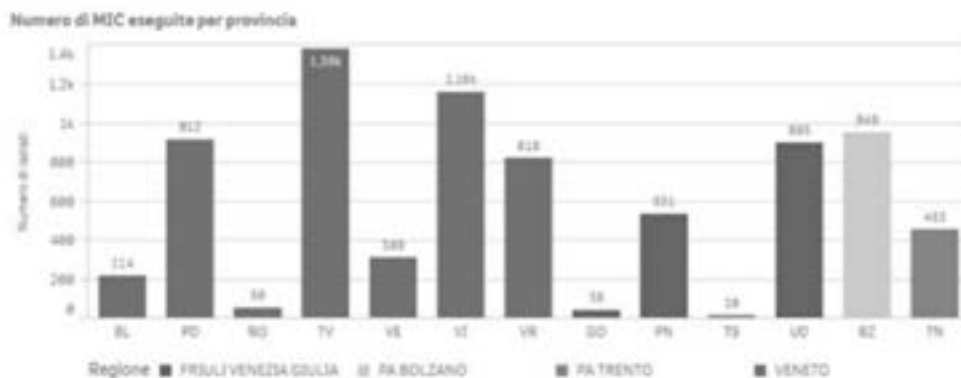


Distribuzione di MIC eseguite per pannello di anti...



Distribuzione territoriale delle MIC eseguite





finora ottenuti, interamente navigabile e basato sulla tecnologia Qlik Sense®.

Fig 3: IZSVe MIC Report pubblico/IZSVe and MIC public report

BIBLIOGRAFIA

1. Barton M. D. Impact of antibiotic use in the swine industry <https://doi.org/10.1016/j.mib.2014.05.017>
2. CLSI M11-A8 (2012). Methods for antimicrobial susceptibility testing of anaerobic bacteria; approved standards - Eight edition;
3. CLSI VET 01-A4. (2013). Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility test for bacteria isolated from animals; approved standards - Fourth edition;
4. CLSI VET 01-S2. (2013). Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility test for bacteria isolated from animals - Second informational supplement;
5. CLSI VET 01-S3. (2015). Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility test for bacteria isolated from animals - Second informational supplement;
6. CLSI M100-S24. (2014). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing twenty fourth informational supplement;
7. CLSI VET-06 (2017). Methods for Antimicrobial Susceptibility Testing of Infrequently Isolated or Fastidious Bacteria Isolated from animals